

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Anna Hronová

Role epigenetických mechanismů v opiátové závislosti
The role of epigenetic mechanisms in opiate dependence

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2020

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V dne

Podpis autora

Poděkování

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za odbornou pomoc a trpělivost při sepisování této práce. Rovněž bych ráda poděkovala své rodině za podporu a umožnění studia na vysoké škole a také svým přátelům za povzbuzení a mnoho cenných rad.

Abstrakt

S chronickým užíváním opioidních látek dochází k rozvoji závislosti a tolerance. Zneužívání opioidních drog s sebou nese sociální, ekonomické a zdravotní následky. Nejběžněji zneužívanou opioidní drogou je heroin, ale stejně tak například morfin, který se v lékařství používá jako analgetikum. Závislost na drogách zahrnuje potenciálně celoživotní abnormality v chování, které jsou indukovány opakovaným užíváním opioidních drog. Persistence behaviorálních změn naznačuje, že dochází k dlouhodobým změnám v genové expresi. Výzkumy ukázaly zásadní roli epigenetických mechanismů při řízení dlouhodobých změn v genové expresi. Studie odhalily zvýšené hladiny permissivní acetylce histonů, snížení úrovně represivní metylace histonů a změny ve vzorcích metylace DNA a v expresi nekódující RNA. Tyto epigenetické modifikace jsou v rámci působení opioidů omezené na mesolimbický a limbický systém, který hraje roli při zpracování emocí, motivace či odměny. Na poli výzkumu vlivu epigenetických mechanismů v opiátové závislosti je ještě mnoho práce. Nicméně dosavadní výzkumy svými výsledky a zjištěními výrazně posouvají chápání, jak opioidy působí trvalé změny ve funkci mozku.

Klíčová slova: Opioidy, drogová závislost, epigenetika

Abstract

Addiction and tolerance develop with the chronic use of opioids. Opioid drug abuse has social, economic and health consequences. The most commonly abused opioid drug is heroin, but so is morphine, which is used in medicine as an analgesic. Drug dependence includes potentially long-term behavioural abnormalities that are induced by repeated use of opioid drugs. The persistence of behavioural changes suggests that there are long-term changes in gene expression. Research has shown the crucial role of epigenetic mechanisms in managing long-term changes in gene expression. Studies have revealed increased levels of permissive histone acetylation, decreased levels of repressive histone methylation, and changes in DNA methylation patterns and non-coding RNA expression. Within the action of opioids, these epigenetic modifications are limited to the mesolimbic and limbic systems, which play a role in the processing of emotions, motivation or reward. There is still much work to be done in the field of research into the influence of epigenetic mechanisms in opiate dependence. However, research to date has significantly shifted the understanding of how opioids cause permanent changes in brain function with their results and findings.

Keywords: Opioids, drug dependence, epigenetics

Obsah

Seznam použitých zkratk	2
Úvod	3
1 Úvod	3
2 Epigenetika a epigenetické modifikace	4
2.1 Přehled mechanismů epigenetické regulace	4
2.2 Modifikace histonů	4
2.2.1 Acetylace a deacetylace histonů	5
2.2.2 Fosforylace histonů	7
2.2.3 Metylace a demethylace histonů	7
2.3 Metylace DNA	8
2.4 Nekódující RNA	12
3 Opioidy	13
3.1 Dělení opioidů	13
3.1.1 Příklady opioidů vyvolávající závislost	14
3.2 Opioidní receptory spřažené s G-proteiny	15
3.3 Účinky opioidních látek na organismus	16
3.3.1 Molekulární mechanismus působení opiátů	17
4 Role epigenetických mechanismů v opiátové závislosti	20
4.1 Vliv opioidů na genovou expresi	20
4.1.1 Acetylace histonů	20
4.1.2 Metylace histonů	21
4.1.3 Metylace DNA	22
4.1.4 Nekódující RNA	23
Závěr	24

Seznam použitých zkratek

5fC	5-formylcytosin
5hmC	5-hydroxymetylcytosin
5mC	5-metylcytosin
AC	adenylátcykláza
AID/APOBEC	<i>angl. activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex</i>
ATP	adenosintrifosfát
BDNF	mozkový neurotrofický faktor
BER	<i>angl. base excision repair</i>
CaMKII	Ca^{2+} /kaldmodulin-dependentní kináza II
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
COMT	katechol-O-metyltransferáza
CREB	<i>angl. cAMP response element-binding protein</i>
DA	dopamin
DAG	1,2-diacylglycerol
DNMT	DNA metyltransferáza
GABA	kyselina γ -aminomáselná
GIT	gastrointestinální trakt
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem
GRK	kináza receptorů spřažených s G-proteinem
GTP	guanosintrifosfát
HATs	histon acetyltransferázy
HDACs	histon deacetylázy
HDMs	histon demetylázy
HMTs	histon metyltransferázy
IL	interleukin
IP ₃	inositol-1,4,5-trisfosfát
LC	locus coeruleus
lncRNA	dlouhá nekódující RNA
MAP	mitogenem aktivovaná proteinkináza
miRNA	mikroRNA
NA	noradrenalin
NAc	nucleus accumbens
PFC	prefrontální mozková kůra
PIP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	proteinkináza A
PLC	fosfolipáza C
PNS	periferní nervová soustava
SAM	S-adenyl methionin
TBP	TATA vazebný protein
TET	<i>angl. ten-eleven translocation proteins</i>
TF	transkripční faktor
TH	tyrosin hydroxyláza
TNF	faktor nádorové nekrózy
VTA	area ventralis tegmenti

1. Úvod

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky vlivu epigenetických modifikací v opiátové závislosti. Závislost na opioidních látkách je z psychologického hlediska klasifikována jako chronické recidivující onemocnění centrální nervové soustavy CNS, které vede k poruchám osobnosti, morbiditám a předčasné smrti. Typický syndrom psychologické závislosti u lidí zahrnuje zintenzívnění dávkování, sníženou vůli, nutkavý příjem drog navzdory povědomí o jejich škodlivých účincích, přetrvávající a opakující se posedlost užíváním drogy, a to i po letech abstinence.

Opioidní drogy se vážou přes opioidní receptory zejména v CNS v centru odměny - v mesolimbickém systému, kde jejich působením dochází ke vzniku euforických stavů a navození celkové tělesné relaxace. Perzistentní adaptace zahrnují stabilní epigenetické modifikace DNA v neuronech postižených účinkem drogy. Epigenetické modifikace modulují genovou expresi, aniž by měnily sekvenci nukleotidů. Děje se tak díky konformačním změnám ve struktuře chromatinu a jeho dostupnosti pro transkripční mašinerie, které transkribují DNA. V důsledku těchto epigenetických změn vyvolaných opioidy se mění úroveň transkripce genů, priming nebo desensitizace konkrétních genů v reakci na drogu. Výsledné transkripční změny ovlivňují efektorové geny zapojené do různých buněčných funkcí, které nakonec způsobují trvalé změny signálních kaskád, buněčné struktury a synaptické aktivity. Epigenetické modifikace jsou rozhodující pro vytvoření a vyvolání dlouhodobé paměti a jejich vliv na programy genové exprese pravděpodobně hrají kritickou roli v souvislosti se závislostí, která je charakterizována touhou po opakovaném užití drogy.

První kapitola pojednává o funkci a mechanismu epigenetických modifikací. Ve druhé kapitole jsou shrnuty fakty o opioidních látkách, závislostech a molekulárním působení a vzniku závislosti. Poslední kapitola propojuje poznatky o epigenetických mechanismech, které jsou indukovány užíváním opioidů a jsou zdrojem dlouhodobých změn v expresi genů.

2. Epigenetika a epigenetické modifikace

Epigenetika je definována jako soubor biochemických procesů, které mají vliv na změnu genové exprese (Wu et al., 2001). Mění se fenotypový projev, ale genotyp jedince zůstává stejný, nemění se tedy sekvence nukleotidů. Funkce epigenetických úprav hraje roli v oblasti genomové stability, která koreluje s dalšími funkcemi, jako je replikace, uspořádávání chromatinu nebo transkripce. Epigenetické modifikace mohou být mitoticky nebo meioticky dědičné (Dupont et al., 2009). Dále se vyznačují variabilní expresivitou a nepravidelnou penetrací. Penetrace určuje, zda se daný genom ve fenotypu projeví, a pokud ano, expresivita označuje míru tohoto projevu. Epigenetické mechanismy poskytují odpověď na otázku, proč organismy během svého vývoje produkují celou řadu buněčných typů navzdory faktu, že velké množství buněk v mnohobuněčném organismu sdílí stejnou genetickou informaci (Dincer, 2016).

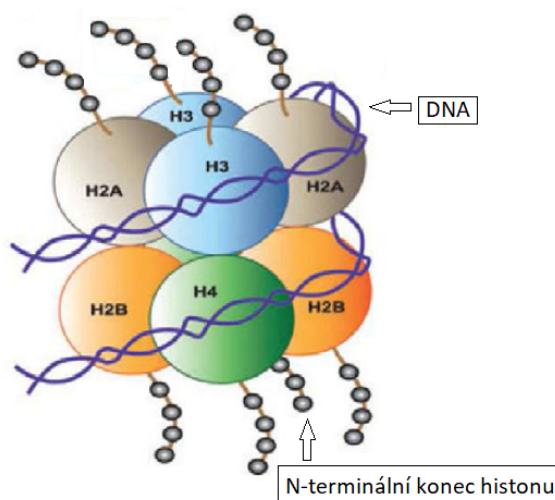
2.1 Přehled mechanismů epigenetické regulace

Epigenetické mechanismy ovlivňují různé jaderné funkce, jako je replikace, transkripce nebo sestavování chromatinu (Maze et al., 2013). Z neurobiologického hlediska regulují normální funkci mozku, neurální plasticitu nebo paměť (Guan et al., 2002; Pittenger et al., 2003). Hlavními epigenetickými mechanismy jsou posttranslační modifikace aminokyselin na N-koncích histonů, kovalentní modifikace DNA (metylace DNA) a RNA interference. Posttranslační modifikace mají vliv na organizaci struktury chromatinu a regulaci genové exprese. DNA je v jádře buňky organizovaná velice kompaktně. Tři miliardy nukleotidů DNA v savčím genomu by v lineární formě byly dlouhé asi dva metry (Jaenisch et al., 2003), proto je nezbytně nutné, aby byl chromatin kompaktně uspořádán do mikroskopického buněčného jádra. Jako chromatin se označuje spojení genomové DNA s histonovými a nehistonovými proteiny (Jaenisch et al., 2003). Funkční jednotkou chromatinu je nukleozom, jehož schéma je znázorněno na obrázku 1.

Nukleozom se skládá z histonového jádra a DNA. Histonové jádro obsahuje dvě kopie každého histonu (H2A, H2B, H3, H4) a je vysoce konzervováno. Okolo jádra je ovinuta DNA složená ze ~ 147 bp (Luger et al., 1997). N-terminální konce histonů ční ven z nukleozomu, jsou tedy přístupné případným epigenetickým modifikacím. Chromatin je substrátem pro procesy, které regulují genovou expresi. Epigenetické mechanismy řídí rozestupy nukleozomů, kondenzaci DNA a tím i její transkripční aktivitu (Arents; Moudrianakis, 1995). Chromatin existuje ve dvou extrémních stavech – kondenzovaný (heterochromatin) a dekonenzovaný (euchromatin). Mimo to se reálně vyskytuje v mnoha mezistavech. Euchromatin je transkripčně aktivní dekonenzovaná oblast genomu a heterochromatin je naopak kondenzovaný a transkripčně inaktivní.

2.2 Modifikace histonů

Histony jsou kladně nabitě, bazické, oktamerní nukleoproteiny. Okolo histonového jádra je ovinuta DNA, jejíž záporně nabitě fosfátové skupiny interagují s kladně nabitými nukleoproteiny a tvoří tak kompaktní strukturu. Mezi základní



Obrázek 1: Schéma nukleozomu - histony H2A, H2B, H3 a H4 jsou vždy ve dvou kopiích, které tvoří jádro nukleozomu, okolo něž je obtočena DNA (~147 bp). N-terminální konce histonů směřují ven z nukleozomu (upraveno podle Nestler, 2014)

histony patří H1, H2A, H2B, H3 a H4, existují však různé varianty lišící se mezi organismy (Arents; Burlingame et al., 1991). Histony H3 a H4 mají vysoký obsah argininu a lysinu (Moss et al., 1977; Simpson, 1978). Jejich funkcí je balení DNA, vzájemná interakce a interakce s jinými chromosomálními proteiny. Histony podléhají různým kovalentním modifikacím, které probíhají primárně na N-terminálním konci, minoritně pak i na C-konci. Reziduální části korových histonových proteinů obsahují vysoce bazické aminokyselinové sekvence, které jsou napříč eukaryotickými organismy konzervovány (Maze et al., 2013). Tyto koncové části histonů slouží jako substrát pro posttranslační modifikace. Posttranslační modifikace může podstoupit každý histonový protein. K N-terminálním zbytkům histonů jsou přidávány různé funkční skupiny, které mění interakci DNA s histony a strukturu nukleozomu. Změny v interakci DNA s histony se projevují relaxací nebo kondenzací chromatinu, což způsobuje zvýšení či snížení pravděpodobnosti transkripce v daném lokusu. Obecně jsou epigenetické modifikace histonů zajišťovány díky velké skupině enzymů, které se označují jako „writers“ (přidávají funkční skupiny) a „erasers“ (odstraňují funkční skupiny). Mezi typické posttranslační modifikace histonů patří například acetylace, metylace na zbytcích lysinu (K) nebo argininu (R), fosforylace na serinových (S) nebo threoninových (T) reziduích, ubiquitinace nebo sumoylace na lysinu (K) a ADP-ribosylace na glutamátu (E) (Nestler, 2014).

2.2.1 Acetylace a deacetylace histonů

Acetylace je kovalentní reverzibilní posttranslační modifikace, která nejčastěji probíhá na postranních řetězcích K na histonech H2A, H2B, H3 a H4 (Kouzarides, 2007). Ovlivňuje organizaci chromatinu v jádře, obecně je spjata s otevřeným stavem chromatinu s aktivací genové exprese. Dále může ovlivňovat buněčný cyklus, RNA splicing, energetický metabolismus nebo dynamiku cytoskeletu (Struhl, 1998). Při přidání acetylové skupiny na zbytek K se sníží jeho kladný náboj, což způsobí pokles afinity záporně nabitých fosfátových skupin DNA. To vede

k relaxaci chromatinu, který dovoluje větší přístupnost transkripčních faktorů (TF) k samotnému vláknu DNA a jeví se jako transkripčně aktivní. Acetylované histony slouží jako značky pro proteiny obsahující bromodoménu. Například iniciační TF TAFII250 obsahuje dvě bromodomény, které rozpoznávají polyacetylovaný histon H4 (Struhl, 1998). TAFII250 spolu s TATA binding proteins (TBP) přijímají další složky transkripčního aparátu včetně RNA polymerázy II, kde posléze dochází k transkripci daného lokusu (Struhl, 1998). Acetylace histonů H3 a H4 je spojená se zvýšenou transkripční aktivitou (Egervari et al., 2017; Z. Wang et al., 2014; Y. Wang et al., 2015; W. S. Chen et al., 2016; Sheng et al., 2011). Enzymy zajišťující acetylaci jsou histonacetyltransferázy (HATs). Enzymy zajišťující deacetylaci jsou histondeacetylázy (HDACs).

Histon-acetyltransferázy

HATs se dělí do tří velkých enzymových rodin - GNAT, MYST a CBP/p300. Každá ze tříd acetyluje histony, ale může acetylovat i nehistonové proteiny, které ovlivňují buněčné signální dráhy.

1. GNAT - Gcn5-related N-acetyltransferase

Z této rodiny jsou nejznámějšími HATs GCN5 a PCAF (p300/CBP associated factor). Oba enzymy acetylují histony H3 a H4. GNAT je nejvíce exprimována v mozku a varlatech, PCAF v játrech. V ostatních tkáních jsou tyto HATs exprimovány v nízkých koncentracích. Nicméně oba enzymy jsou exprimovány v nižších koncentracích ve všech tkáních (W. Xu et al., 1998).

2. MYST (MOZ / Ybf2 / Sas2,3 / Tip60)

Enzymy z rodiny MYST jsou sekvenčně podobné skupině histonacetyláz z rodiny GNAT, ale velmi se liší svou funkcí. Regulují expresi genů u různých patologií, jako je HIV nebo leukémie. Acetylují histony H3, H4 a H2A (Taverna et al., 2006).

3. CBP/p300-CREB-binding protein/protein acetyltransferase of 300 kD

Acetylázy z této rodiny jsou spojeny s mechanismy učení, paměti a drogovými závislostmi. Acetylují histony H2A, H2B, H3 a H4 a jsou rekrutovány specifickými geny díky interakci s transkripčními faktory (např. CREB, Fos/Jun) (Marmorstein, 2001).

Histon-deacetylázy - HDACs

HDACs se rozděluje do čtyř základních tříd - rpd3, hda1, sir2 a HDAC IV. třídy.

1. **Histon-deacetyláza rpd3**

Katalytická aktivita je regulována fosforylací kaseinovou kinázou II pro HDAC 1-3 a PKA pro HDAC8. U savců se exprimuje všudypřítomně, více než-li hda1. Společně s hda1 sdílí katalytickou doménu a jako kofaktor slouží Zn (Yang et al., 2008).

2. **Histon-deacetyláza hda1**

HDAI řídí subcelulární lokalizaci a partnerské interakce. Reagují na četné stimuly prostředí, od nervové signalizace až po poškození DNA. Například Ca^{2+} aktivuje CaMKII (calmodulin-dependent protein kinase II), která fosforyluje HDAC4/HDAC5. Fosforylované HDAC4/5 rekrutují 14-3-3 β -proteiny a tak usnadňují jejich jaderný export a snižují aktivitu v jádře. O cytoplazmatické aktivitě HDACs II. třídy není nic známo (Kawaguchi et al., 2003).

3. **Sirtuiny - SIRT1-7**

Strukturně a mechanicky se liší od všech tříd. K deacetylaci jako kofaktor vyžadují NAD^+ místo obvyklého Zn. Vzhledem k tomu, že potřebuje NAD^+ , předpokládá se, že jeho činnost je závislá na metabolickém stavu buňky (NAD^+/NADH) (Michan et al., 2007).

4. **Histon-deacetylázy IV. třídy**

HDAC IV. třídy jsou strukturně příbuzné s rpd3 a hda1 a sdílí s nimi některé funkce. Bohužel o této třídě HDAC není mnoho známo (Renthal et al., 2009).

2.2.2 **Fosforylace histonů**

Fosforylace je posttranslační modifikace, která obvykle koreluje s transkripční aktivací. Fosforylace serinu 10 na histonu H3 (H3S10) podporuje asociaci a stabilizaci HAT-GCN5. Následně antagonizují represivní metylaci lysinu 9 na histonu H3. Blokace represivní metylace H3K9 je způsobena tím, že fosforylace H3S10 asociuje HAT, která acetyluje sousední H3K9. Dohromady se to nazývá fosfoacetylce. Fosfoacetylce je často pozorována na promotorech IEGs genů (immediate early genes), jako je třeba c-fos, který je následovaný indukci glutamátu nebo cAMP v kultivovaných striatálních neuronech. Stimulace ne vždy má za následek zvýšenou acetylaci a poskytuje další důkaz, že ačkoli tyto aktivační značky jsou přidružené, mohou fungovat a samostatně řídit „downstream“ transkripční události (Brami-Cherrier et al., 2007).

2.2.3 **Metylace a demethylace histonů**

Metylace je reverzibilní posttranslační modifikace, která probíhá na K nebo R reziduích histonů H3 a H4. Metylaci histonů však není tak snadné kategorizovat jako acetylaci, nelze ji zařadit mezi aktivační nebo represivní modifikace, protože může provádět obojí. Přidání metylové skupiny se může překrývat s acetylovanými úseky, což způsobuje nejednoznačnost této modifikace. Je to stěžejní modifikace pro organizaci chromatinu, regulaci transkripce genů ve vývoji mozku, synaptické plasticitě a epigenetické dědičnosti (Licciardello et al., 2016; J. Xu

et al., 2011). Metylaci K nebo R zajišťuje souhra enzymů histon-metyltransferáz (HMTs) a demetylaci provádějí histon-demetylázy (HDMs). Enzymy jsou výjimečné stupněm specifičnosti substrátů a produktů, nerozlišují substrát na základě jeho sekvenčního kontextu, ale pevně regulují stupeň metylace. Kontrolují mono-, di- a trimetylační stavy na ϵ -aminoskupině lysinu a mono-, symetrické di- a asymetrické dimetylace argininů. Každá HMTs a HDMs je přednostně exprimována v určitých typech buněk, kde působí na cílové geny (J. Xu et al., 2011). Někteří vazební partneři mohou měnit aktivitu a specifičnost modifikátorů, kromě toho katalytická aktivita enzymů závisí na přítomnosti a koncentraci určitých kofaktorů. Tyto kofaktory jsou klíčovými metabolity v biochemických drahách, čímž spojují chromatin s buněčným metabolismem. Všechny výše uvedené mechanismy přímo ovlivňují katalytické aktivity metyltransferáz a demetyláz a tím mění globální úroveň úprav, které katalyzují (Licciardello et al., 2016).

Metylace lysinu

Metylace K zbytku je u savců katalyzována rodinou HMTs DOT1L. Tato modifikace udílí aktivační či represivní funkci chromatinu. Zejména metylace H3K4, H3K36 a H3K79 je spojena s aktivními oblastmi chromatinu, zatímco metylace H4K20 a di-metylace nebo tri-metylace na H3K9 a na H3K27 obvykle umlčují danou oblast chromatinu (Lachner et al., 2001; Taverna et al., 2006; Bannister et al., 2001; Huang et al., 2006) Metylace K neudílí histonu celkový náboj jako u acetylace, což značí, že tyto modifikace fungují spíše jako značky pro ukládání informací. Na podporu této hypotézy jsou důkazem efektorové proteiny, které specificky rozpoznávají metylované stavy K a mají k nim větší či menší afinitu a tak regulují funkci chromatinu. Každá amino skupina K může být modifikována přidáním jedné (me1), dvou (me2) nebo tří (me3) metylových skupin. Definovaný metylační stav K zbytku může mít různé funkční důsledky, protože efektorové proteiny mohou s různou afinitou rozpoznávat metylační stavy (J. Xu et al., 2011).

2.3 Metylace DNA

Metylace DNA je jedna z prvních objevených regulací genové exprese. Byla objevena ještě před identifikací DNA jako nositel genetické informace (Avery et al., 1944). Primárně se jedná o epigenetický mechanismus zahrnující přenos metylové skupiny z S-adenyl methioninu (SAM) na pozici pátého uhlíku cytosinu za vzniku 5-methylcytosinu (5mC). Zajišťuje regulaci exprese genů, inaktivaci X-chromozomu, diferenciaci buněk nebo také genomický imprinting. Metylace DNA je považována za stabilnější epigenetickou modifikaci, než jsou histonové modifikace, které jsou snadno reverzibilní. Obecně je spjatá s útlumem transkripce, fyzicky blokuje přístup RNA polymerázy II. Modifikace je katalyzována DNA metyltransferázami (DNMTs) a má obecně represivní účinek, ale stejně tak může aktivovat transkripci (Moore et al., 2013). Represe probíhá inhibicí vazby TF na jejich cílovou sekvenci nebo se vážou na proteiny vazebné metyl-CpG, které rekrutují transkripční ko-represory k úpravě okolního chromatinu do umlčeného stavu. Mozek představuje oblast s nejvyšší úrovní DNA metylací, přesahující metylace v jakékoliv tkáni v těle (Goto et al., 1994). V každé tkáni má metylace specifickou funkci. Oblasti spojené s metylací DNA jsou „CpG sites“ a „gene bodies“, ale existuje důkaz

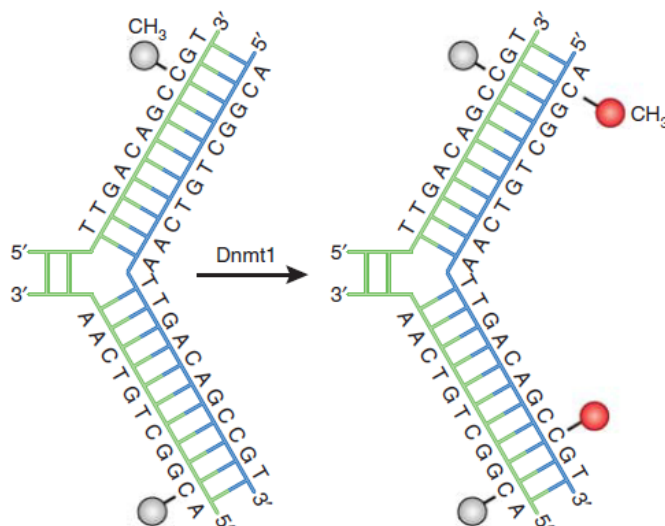
o metylaci mimo „CpG sites“ u myši a lidských embryonálních kmenových buněk, nicméně tyto metylace jsou ztraceny v diferencovaných tkáních (Goto et al., 1994). Přítomnost 5mC má obecně represivní účinek, kdežto 5hmC během genové exprese koreluje s transaktivací (Szulwach et al., 2011). Během vývoje se metylace DNA mění v důsledku dynamického procesu zahrnující *de novo* metylaci a demetylaci DNA. U diferencovaných buněk se tvoří jedinečný vzorec metylace DNA, který reguluje tkáňovou specifitu transkripce genů. Vzorce metylace se mohou měnit a mění se v důsledku vývojových mutací nebo enviromentálních rizikových faktorů, jako je například vystavení organismu určitým lékům či drogám. Následná mentální poškození jsou vedlejšími účinky (LaPlant et al., 2010).

DNA metyltransferázy

DMNTs katalyzují přidání metylových skupin na DNA, přičemž mají podobnou strukturu, ale liší se funkcemi. DNA metylázy se dělí do tří rodin, do kterých patří DNMT1, DNMT3a a DNMT3b, DNMT3L.

1. DNMT1

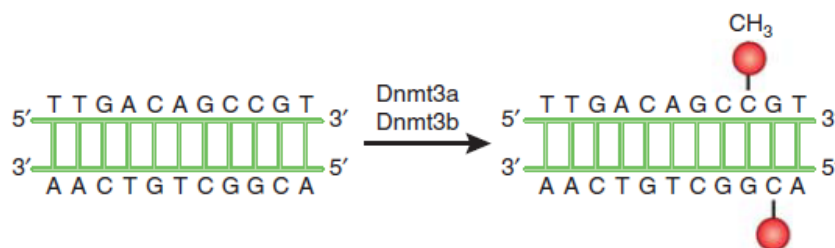
DNMT1 je hojně exprimována všech savčích tkáních, včetně mozku (Goto et al., 1994). Přednostně metyluje hemimetylovaná vlákna a během replikace DNA udržuje vzorec metylace na nově syntetizovaných vláknech (Hermann et al., 2004). DNMT1 hraje rozhodující roli v buněčné diferenciaci a dělení buněk (Moore et al., 2013). Methylace enzymem DNMT1 je znázorněna na obrázku 3.



Obrázek 2: Schéma metylace DNA metyltransferázou Dnmt1 - původní metylační vzorec (šedá metylová skupina) na mateřském (zeleném) vlákne. DNMT1 přesně replikuje původní vzorec metylace DNA přidáním metylové (červené) skupiny na dceřiné vlákno (modré) (převzato od Moore et al., 2013)

2. DNMT3a a DNMT3b

DNMT3a a DNMT3b jsou označovány jako *de novo* DNMT, protože jsou schopné zavádět metylace na „nahá“ vlákna DNA bez preference hemimetylovaného stavu (Okano et al., 1999). DNMT3a je vyžadována pro normální buněčnou diferenciaci a je všudypřítomně exprimována ((Moore et al., 2013)). Naopak DNMT3b je hlavně exprimována během raného vývoje embrya. V diferencovaných buňkách je exprimována v minimální míře, ve štítné žláze, varlatech a kostní dřeni je exprimována hojně (Moore et al., 2013). Schéma metylace pomocí Dnmt3a a Dnmt3b je uvedeno na obrázku 3.



Obrázek 3: Schéma *de novo* metylace DNA methyltransferázami Dnmt3a a Dnmt3b - metylové skupiny (červené) jsou přeneseny na nahé vlákno DNA (převzato od Moore et al., 2013)

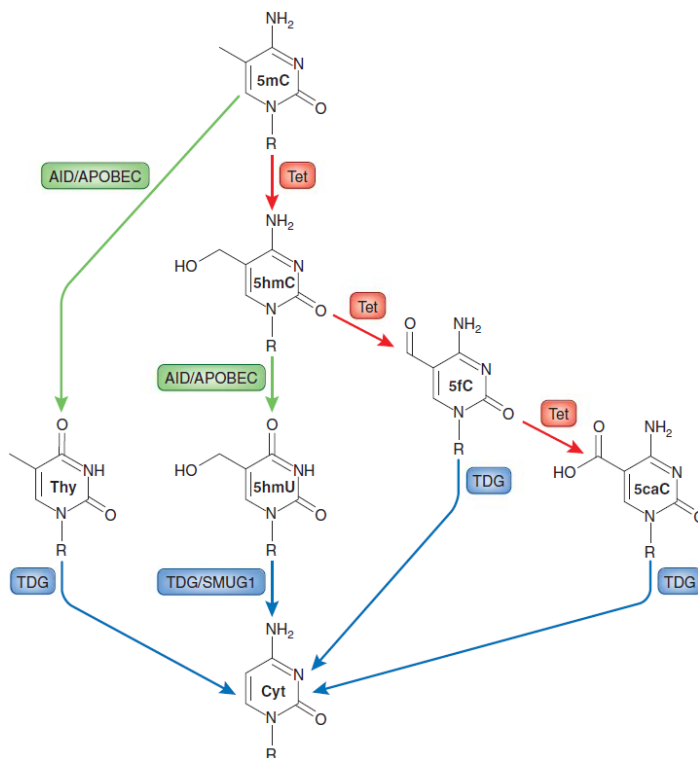
3. DNMT3L

Narozdíl od ostatních DNA methyltransferáz, DNMT3L nemá katalytickou doménu (Aapola et al., 2000; Hata et al., 2002), ale je stěžejní pro stimulaci DNMT3a a DNMT3b. Během raného vývoje je její výskyt omezen na zárodečné buňky a v dospělosti na brzlík. Její přítomnost je vyžadována při maternálním a paternálním imprintingu, pro metylaci retrotranspozonů a inaktivaci X-chromozomu (Aapola et al., 2000). DNMT3L je exprimována ve vyvíjícím se mozku, kde je však downregulována při neurální diferenciaci, a v postnatálním období již chybí (Kovacheva et al., 2007; Lee et al., 2006).

Demethylázy a demethylace DNA

Demethylázy mají velkou roli v opravě DNA a probíhají několika mechanismy, které se vzájemně kompenzují. Demethylace může probíhat aktivním nebo pasivním způsobem. Pasivní demethylace je častá v dělicích se buňkách díky DNMT1, která udržuje stávající metylační vzorce a nezavádí nové metylace (Moore et al., 2013). Aktivní způsob demethylace probíhá na amino nebo metylové skupině 5mC. Při modifikaci amino skupiny dochází k deaminaci za vzniku karbonylové skupiny pomocí AID/APOBEC (activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex). Z 5mC vznikne thymín, který vytvoří pár s guaninem. Tento nesoulad v párování indukuje BER base excision repaire), který thymín nahrazuje cytosinem (Rai et al., 2008). Modifikace na metylové skupině zavádí TET (ten-eleven-translocation protein) enzymy, které přidávají na metylovou skupinu hydroxylovou skupinu za vzniku 5hmC (Tahiliani et al., 2009). 5hmC může být modifikováno dvěma způsoby. První způsob modifikace 5hmC je oxidace pomocí TET enzymů na 5-formylcytosin (5fC), kdy následuje

opětovná oxidace díky TET za vzniku 5-karboxycytosinu (5caC). 5caC je BER nahrazen cytosinem (Ito et al., 2011). Druhý způsob převádí 5hmC deaminací díky AID/APOBEC na 5-hydroxymethyluracil (5hmU), který je TDG/SMUG1 přeměněn na cytosin (Guo et al., 2011). Souhrn těchto mechanismů je znázorněn na obrázku 4.



Obrázek 4: Schéma demethylace DNA. 5mC - 5-methylcytosin, 5hmC - 5-hydroxymethylcytosin, 5fC - 5-formylcytosin, 5-caC - 5-karboxycytosin, 5hmU - 5-hydroxymethyluracil, AID/APOBEC - activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex, TET - ten-eleven-translocation protein, TDG - thymine DNA glykosyláza, TDG/SMUG1 - single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase (převzato od Moore et al., 2013)

CpG ostrůvky

CpG ostrůvky jsou oblasti DNA s vyšší hustotou cytosin-fosfát-guaninu (CpG), než mají ostatní části genomu, a jsou často nemetylované (Deaton et al., 2011). Jsou to oblasti DNA (cca 1 000 bp dlouhé) ((Deaton et al., 2011)), které jsou tkáňově specifické (Rakyan et al., 2004) a nachází se zde více než polovina genových promotorů (Saxonov et al., 2006), zejména promotory pro „housekeeping genes“. Promotory pro „housekeeping genes“ jsou málokdy metylované (Gardiner-Garden et al., 1987). Role CpG ostrůvků není stále úplně jasná. Metylace CpG oblastí může oslabovat vazbu transkripčních faktorů, rekrutovat represivní metyl-vazebné proteiny a stabilně umlčovat genovou expresi (Moore et al., 2013). Během gametogeneze a časného embryonálního vývoje podstupují CpG ostrůvky diferenciální metylaci, která je důležitá pro genový imprinting (Caspary et al., 1998; Wutz

et al., 1997). „Břehy“ CpG ostrůvků mají vysoce konzervované vzorce tkáňově specifické metylace, která koreluje se sníženou genovou expresí (Rakyan et al., 2004).

Gene bodies

Jako gene body se považuje oblast genu, která začíná za promotorem a obsahuje exony a introny (Moore et al., 2013). Methylace DNA v gene bodies u rychle dělících se buněk je spjata se zvýšením genové exprese (Hellman et al., 2007). Naopak u pomalu dělících nebo nedělících se buněk, jako jsou například nervové buňky, methylace gene bodies koreluje se sníženou hladinou genové exprese (Aran et al., 2011; Guo et al., 2011).

2.4 Nekódující RNA

V genomu se nachází velké množství nekódujících RNA, tzn. RNA, které nejsou translatovány. Nekódující RNA ovlivňuje regulaci genové transkripce a má klíčovou roli pro buněčné funkce (Salinas et al., 2020). Jedny z nejvíce studovaných nekódujících RNA jsou mikroRNA (miRNA). Jejich typická délka se pohybuje v rozmezí 20-25 nt. Zprostředkovávají cílenou vazbu na mRNA, kterou buďto inhibují nebo vyvolávají její rozpad. Další důležitou skupinou jsou dlouhé nekódující RNA (lnc RNA), které jsou polyadenylované a mají délku větší než 200 nt. Jsou klíčovými regulátory genové transkripce, přičemž ovlivňují chromatin modifikující komplexy přímou interakcí s TF a dalšími jadernými proteiny. Mohou ovlivňovat pluripotenci a diferenciaci buněk (Salinas et al., 2020).

3. Opioidy

Opioidy se definují jako látky, které interagují s opioidními receptory (OR) a aktivují je. Jsou skupinou léčivých látek, které se používají v medicíně jako analgetika, v paliativní péči nebo jako anestetika (Beecher, 1946). Jejich analgetické účinky jsou známy od dob starověkého Řecka, avšak jejich užití v klinické farmakologii se zintenzivnilo po extrakci morfinu z máku setého, *Papium somniferum*, v roce 1806 a další nárůst užívání byl zaznamenán v roce 1853, kdy byly vyvinuty hypodermické jehly (Blakemore et al., 2002).

Opioidy jsou hojně zneužívány jako „rekreační drogy“ pro své psychotropní účinky. Mezi opioidní drogy patří například morfin, heroin, kodein, fentanyl, methadon a hydromorfon hydrochlorid. Způsobují duševní relaxaci, úlevu od bolesti a euforii. Chronické užívání opioidů vede k rozvoji psychické a fyzické závislosti uživatele na droze (Egervari et al., 2017). Fyzická závislost je spojená s neuroadaptivními změnami v centrální nervové soustavě (CNS) na buněčné a molekulární úrovni. Tyto změny jsou zodpovědné za rozvoj abstinčního syndromu po vysazení drog. Závažnost abstinčního syndromu koreluje s různými faktory, jako je typ drogy, délka doby užívání, věk nebo genetická predispozice (Egervari et al., 2017).

Abstinční syndrom je život ohrožující stav vyplývající ze závislosti na opioidech. *World Health Organization* (WHO) definuje závislost na opioidech jako charakterizované nahromadění změn v kognitivních, behaviorálních a fyziologických vlastnostech. Identifikovali těchto šest charakteristických rysů: silné nutkání znovu užít opioidní substanci, obtíže s kontrolou podávání opioidů, fyziologický abstinční stav, toleranci, progresivní zanedbávání alternativního potěšení z důvodu užívání opioidů a přetrvávající užívání opioidů navzdory jejich škodlivým účinkům (*Information sheet on opioid overdose*, 2018). Abstinční syndrom se projevuje například slzením nebo výtokem z nosu, piloerekcí - „husí kůže“, myalgií, průjmem, nauzeou až zvracením, dilatací zornic a fotofobií, nespavostí a autonomní hyperaktivitou (tachypnoe, hyperreflexie, tachykardie, pocení, hypertenze) (Ramesh et al., 2011).

Psychická závislost je klasifikována jako chronické recidivující onemocnění CNS, které vede k poruchám osobnosti, morbiditám a předčasné smrti. Typický syndrom psychologické závislosti u lidí zahrnuje zintenzívnění dávkování, sníženou vůli, nutkavý příjem drog navzdory povědomí o jejich škodlivých účincích, přetrvávající a opakující se posedlost užíváním drogy, a to i po letech abstinence (Le Merrer et al., 2009).

3.1 Dělení opioidů

Opioidy se dělí na endogenní a exogenní. Exogenní opioidy se dále dělí podle jejich chemických struktur a farmakodynamického účinku.

Endogenní opioidy

Endogenní opioidy jsou opioidní peptidy člověkem nebo živočichem produkováné ligandy OR. Patří mezi ně endorfiny, enkefaliny, dynorfin a endomorfiny

(Lord et al., 1977). Vyznačují se různými fyziologickými a farmakologickými účinky u savců a lidí. K fyziologickým účinkům řadíme modulaci pohybových funkcí, imunitní reakce, příjem vody a potravin, regulaci gastrointestinálního traktu (GIT) a kardiovaskulárního systému, neuroendokrinní a kognitivní funkce. Zásadním farmakologickým účinkem je analgezie nebo úleva od bolesti (Beecher, 1946).

Exogenní opioidy

1. Přirozeně se vyskytující opioidy

Přirozeně se vyskytující opioidy jsou deriváty opia. Do této skupiny se řadí například morfin, thebain, papaverin, kodein. Látky patřící do této skupiny jsou především užívány pro jejich analgetické účinky (Beecher, 1946).

2. Semisyntetické deriváty

Mezi semisyntetické deriváty přírodních alkaloidů patří například diacetylmorfin (heroin), hydromorfon a oxykodon (Blakemore et al., 2002).

3. Syntetické opioidy

Syntetické opioidy se používají jako velice silná analgetika. Například metadon běžně slouží k prevenci relapsu závislých jedinců na opioidech, a to kvůli dlouhodobějším účinkům, které zabraňují abstinčním syndromu (Isbell et al., 1950). Mezi další zástupce patří deriváty 4-anilidopiperidinu - fentanyl, alfentanil nebo deriváty difenylpropylaminu - propoxyfen, dextropropoxyfen, metadon a další (Shafer et al., 2008).

3.1.1 Příklady opioidů vyvolávající závislost

Morfin

Jedná se o přírodní alkaloid vyskytující se v opiu a v medicíně využívaný jako analgetikum. Morfin působí sedaci, euforii nebo může například tlumit úzkosti. Používá se pro výrobu dalších návykových látek, například pro přípravu heroínu (Dole et al., 1967). Morfin se váže na μ OR a indukuje dopaminergní mesolimbickou dráhu, která je důležitým místem pro vznik závislosti. Působení morfinu, na vyvíjející se i plně vyvinutý mozek dospělého jedince, způsobuje změny v plasticitě na excitačních postsynaptických místech v mozkových oblastech mesolimbického a limbického systému zapojených do funkcí odměny a učení (Matthes et al., 1996).

Morfin se přednostně váže na μ OR, s nižší intenzitou pak na δ nebo κ OR. Působením přes μ receptor je schopen inhibovat GABAergní interneurony v oblasti area ventralis tegmenti (VTA), což způsobuje abnormální neurotransmisi dopaminu (DA) do nucleus accumbens (NAc). To navozuje stavy uvolnění a euforie. Antinociceptivní a návykové účinky a euforické pocity navozené morfinem jsou zprostředkovány právě prostřednictvím μ OR (Matthes et al., 1996).

Způsoby užívání morfinu jsou různorodé. Morfinové tablety se mohou užívat orálně či rektálně. Dále se morfin může aplikovat intramuskulárně a intravenózně. Rizikem dlouhodobého užívání je rozvoj tolerance a závislosti (Matthes et al., 1996).

Heroin

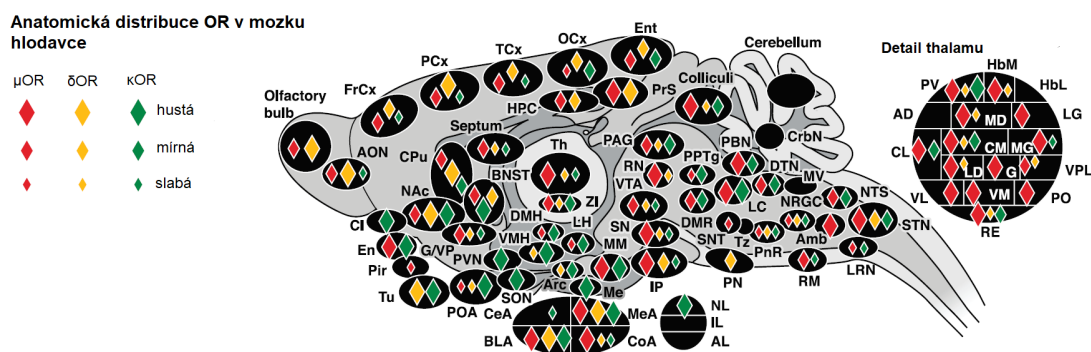
Diacetylmorfin neboli heroin je semisyntetický derivát morfinu. Je ho možné využít jako analgetikum, ale spíše je známý jako „pouliční droga“. Heroin primárně působí přes μ OR ve striatu. Zároveň je považován za jednu z nejnávykovějších drog (Dole et al., 1967).

Jelikož se heroin řadí mezi opiáty, má silné analgetické účinky, s nimiž přichází pocit uvolnění a zpomalené vnímání okolního světa. Vyvolává silnou euforii, která postupně mizí s nastupující tolerancí k droze. Může se užívat intravenózně po zahřátí, inhalací - „šňupáním“ nebo kouřením. Heroin působí velmi rychle, což je dáno jeho vysokou rozpustností a následným rychlým průchodem přes hematoencefalickou bariéru (Blakemore et al., 2002). Opakované užívání heroinu vede k výrazným změnám plasticity striata, toleranci a závislosti (Egervari et al., 2017).

3.2 Opioidní receptory spřažené s G-proteiny

Opioidní receptory jsou skupinou receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR). Sestávají se ze sedmi transmembránových domén, přičemž tři smyčky vyčnívající do extracelulárního prostředí svou N-koncovou částí a další tři intracelulární smyčky ční do cytosolu C-koncem (Morris et al., 1999). Opioidní receptory se dělí na μ ($\mu 1$, $\mu 2$, $\mu 3$), δ ($\delta 1$, $\delta 2$, $\delta 3$) a κ ($\kappa 1$, $\kappa 2$, $\kappa 3$) a non-opioidní receptor orphanin FQ/nociceptin (Morris et al., 1999). μ OR se vyskytují v oblasti mesolimbického systému, hlavně pak v amygdale, thalamu a některých částech mozkového kmene (Le Merrer et al., 2009).

OR jsou široce exprimovány napříč centrální nervovou soustavou a periferní nervovou soustavou (PNS). V CNS primárně pak v kortexu, limbickém systému a mozkovém kmeni (Le Merrer et al., 2009). Anotomickou distribuci jednotlivých druhů OR v mozku hlodavce znázorňuje obrázek 5. Taktéž byly OR objeveny na periferiích aferentního nervstva, které terminuje například v GIT nebo respiračním traktu (Law et al., 2004).



Obrázek 5: Anatomická distribuce OR v mozku hlodavce - barvy odpovídají každému ze tří typů OR. Hustota je znázorněna velikostí symbolů (upraveno podle Le Merrer et al., 2009)

3.3 Účinky opioidních látek na organismus

Opioidy v CNS vyvolávají silnou analgezii, euforii, sedaci, změny nálady, ospalost a zmatenost (Blakemore et al., 2002). V periferní nervové soustavě způsobují endogenní dysregulaci, miózu, antitusickou aktivitu, respirační depresi, křeče, sníženou gastrointestinální motilitu, nauzeu (příp. zvracení), zácpu a nadýmání střev. Mají také přímé kardiovaskulární účinky, snižují krevní tlak, způsobují vazodilataci a snižují srdeční činnost (Inturrisi, 2002). S rostoucí dávkou opioidní látky v organismu roste analgetický efekt, který může vést až ke ztrátě vědomí, zástavě dechu a oběhové soustavy (Cherny et al., 2015).

Působení opioidů v oblasti area ventralis tegmenti a nucleus accumbens

Opioidy působící v oblasti mesolimbického systému vyvolávají euforické stavy. Mesolimbický dopaminergní systém představují dopaminergní neurony v area ventralis tegmenti s axonálním přesahem do nucleus accumbens septi a prefrontálního kortexu (PFC). Tato část mozku se podílí na motivaci, odměně a trestu, pudovém chování a vzniku závislosti (Romo et al., 1990). Mesolimbický systém se též označuje jako centrum odměny.

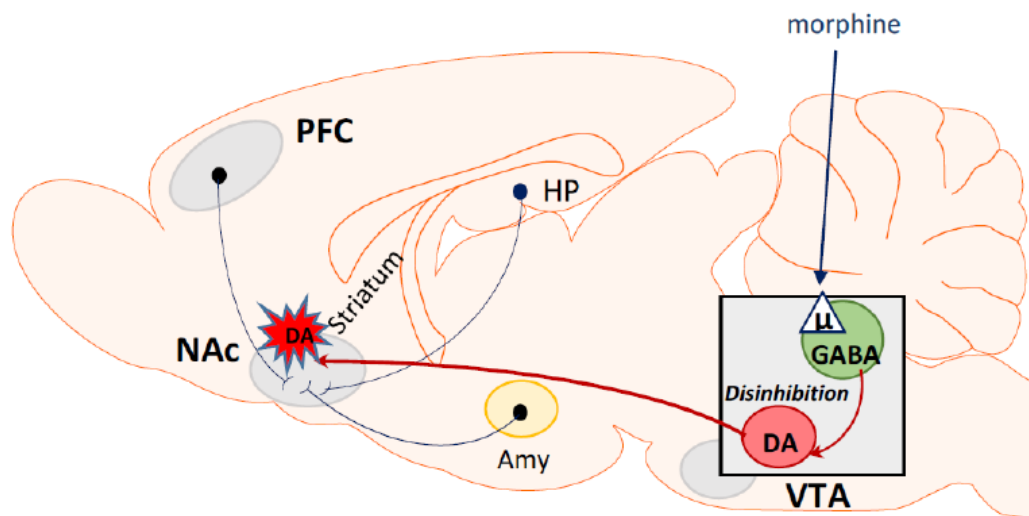
Role opiátů ve funkčnosti systému odměny je spojován se stimulací μ OR, které jsou lokalizovány v GABAergních interneuronech VTA. Enormní uvolňování dopaminu (DA) z VTA do NAc je dosaženo inhibicí GABAergních interneuronů, které disinhibují dopaminergní neurony, které touto disinhibicí neustále uvolňují velké množství DA do NAc. Nadměrná neurotransmise DA navozuje pocity euforie a v raných stádiích závislosti potřebu po opětovném podání další dávky drogy, posiluje rozvoj a udržování závislosti (Kühn et al., 2012). Působení morfinu na mesolimbickou dráhu je znázorněn na obrázku 6.

Působení opioidů v oblasti locus coeruleus

Locus ceruleus (LC) je noradrenergím jádrem a je do značné míry zapojen do projevu abstinčního syndromu. Opioidy působící v LC navozují fyzické uvolnění a po odejmutí drogy fyzické abstinční symptomy. Intracelulární cAMP spouští neurotransmisi noradrenalinu (NA) a před zahájením užívání opioidů dochází k takovému uvolňování NA, které udržuje organismus v optimálním stavu bdělosti, svalovém napětí atp. Po akutní stimulaci μ OR v LC morfinem klesá aktivita adenylátacyklázy (AC), tudíž dochází ke snížení intracelulární koncentrace cAMP, což omezuje neurotransmisi NA (Lane-Ladd et al., 1997). To má za následek celkové fyzické uvolnění - sedaci, snížení svalového napětí a respirační depresi.

Při opakované expozici opioidům buňka zvyšuje zásoby AC a ATP a může se tvořit dostatečné množství cAMP pro kompenzaci inhibičního účinku drogy a neurony uvolňují zhruba stejné množství NA navzdory přítomnosti drogy. V této fázi závislosti jedinec již neprožívá stavy vyvolané drogou se stejnou intenzitou jako při akutním podání. Pokud je droga po chronickém užívání odebrána, inhibiční účinek drogy je ztracen a cAMP se v buňce nachází ve vysokých koncentracích. Takto abnormálně vysoké hladiny cAMP vedou k nadměrnému uvolňování NA. Pacient má klinické příznaky abstinčního syndromu, například trpí nervozitou, úzkostmi nebo svalovými křečemi. Pokud nejsou po několika dnech či týdnech drogy

přijímány, aktivita AC a neurotransmise se vrátí do původního stavu (Kosten et al., 2002).



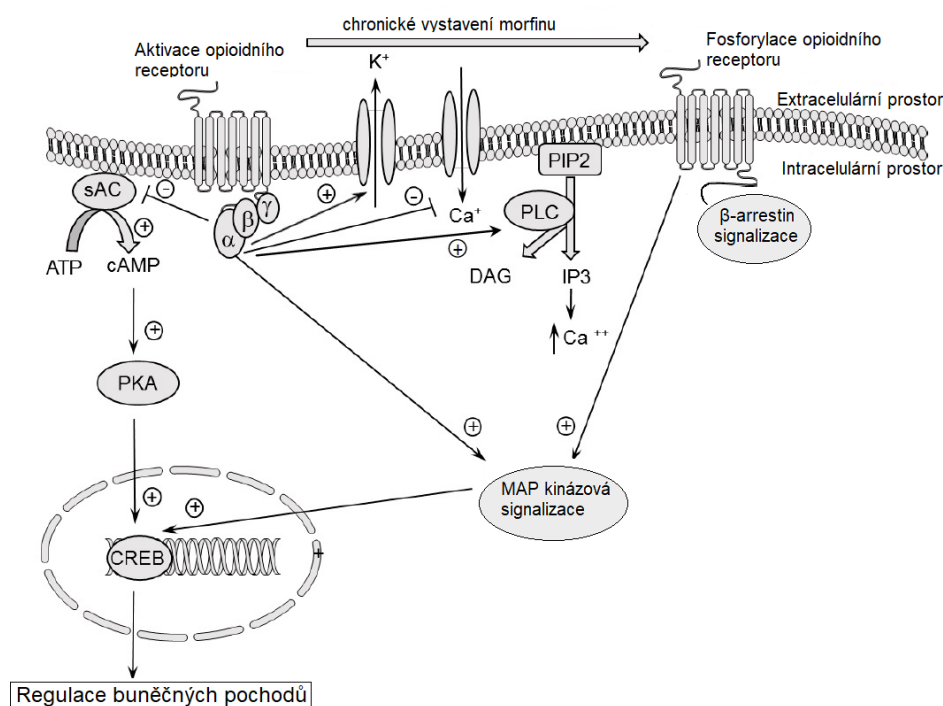
Obrázek 6: Stimulace mesolimbické dráhy morfinem - PFC - prefrontální kortex; NAc - nucleus accumbens; HP - hypothalamus; Amy - amygdala; VTA - area ventralis tegmenti; GABA - kyselina gama-aminomáselná; DA - dopamin (převzato Listos et al., 2019)

3.3.1 Molekulární mechanismus působení opiátů

Navázání ligandu na receptor vede ke konformačním změnám heterotrimerního G-proteinu připojeného k C-konci receptoru. G-proteiny se skládají ze tří podjednotek - α , β a γ . Při aktivaci na podjednotce G_α dochází k nahrazení GDP za GTP a k disociaci od dimeru $G_{\beta\gamma}$. Oba dva komplexy se podílejí na intracelulární signální transdukcii prostřednictvím druhých posílů. Podjednotka G_{α_i} inhibuje AC, což vede k redukci intracelulární koncentrace cAMP (Sharma et al., 1977; Chakrabarti et al., 2016). cAMP v buňce funguje jako druhý posel a aktivuje proteinkinázu A (PKA), která fosforyluje CREB (cAMP response element-binding protein) a tak ovlivňuje jeho aktivitu (Fleming et al., 1992; Zhang; Pan, 2010). $G_{\beta\gamma}$ v presynaptických GABAergních neuronech přímo blokuje vápníkové kanály (P/Q-typ, N-typ a L-typ), takže nemůže dojít k influxu Ca^{2+} , což potlačuje výlev neurotransmiteru GABA (kyselina γ -aminomáselná). GABA je hlavní inhibiční mediátor a blokováná neurotransmise disinhibuje postsynaptický dopaminergní neuron, který nadměrně uvolňuje DA. Dimer $G_{\beta\gamma}$ v postsynaptickém neuronu interaguje s draslíkovými kanály (GIRK) a otevírá je, dochází k efluxu K^+ a hyperpolarizaci buňky, což snižuje její dráždivost. Účinky stimulace OR opioidními ligandy na aktivitu draslíkových a vápníkových kanálů byly opakovaně prokázány v různých oblastech mozku (např. hipokampus, locus coeruleus) a tento mechanismus je považován za klíčový efekt stimulu (Nestler, 1994).

Akutní podání morfinu zvyšuje aktivitu serin/threoninové kinázy GRK (G protein-coupled receptor kinase), která fosforyluje OR a podporují navázání β -arrestinu. β -arrestin je cytosolický protein, který se váže na povrch OR po fosforylaci GRK. Po navázání β -arrestinu dochází k odpojení heterotrimerního

G-proteinu, což činí receptor inaktivním (Fan et al., 2003). Tato akce GRK může být podpořena internalizací receptoru prostřednictvím klatrin-dependentní dráhy (Goodman et al., 1998). Molekulární mechanismus působení morfinu, je znázorněn na obrázku 7.



Obrázek 7: Molekulární mechanismus působení morfinu. sAC solubilní adenylylcykláza; PKA – proteinkináza A; CREB – cAMP response element binding protein; PIP2 – fosofatidylinositol-4,5-bisfosfát; PLC - fosfolipáza C; DAG - 1,2-diacylglycerol; IP3 - inositol-1,4,5-trisfosfát; MAPK–mitogenem aktivovaná proteinkináza (upraveno podle Listos et al., 2019)

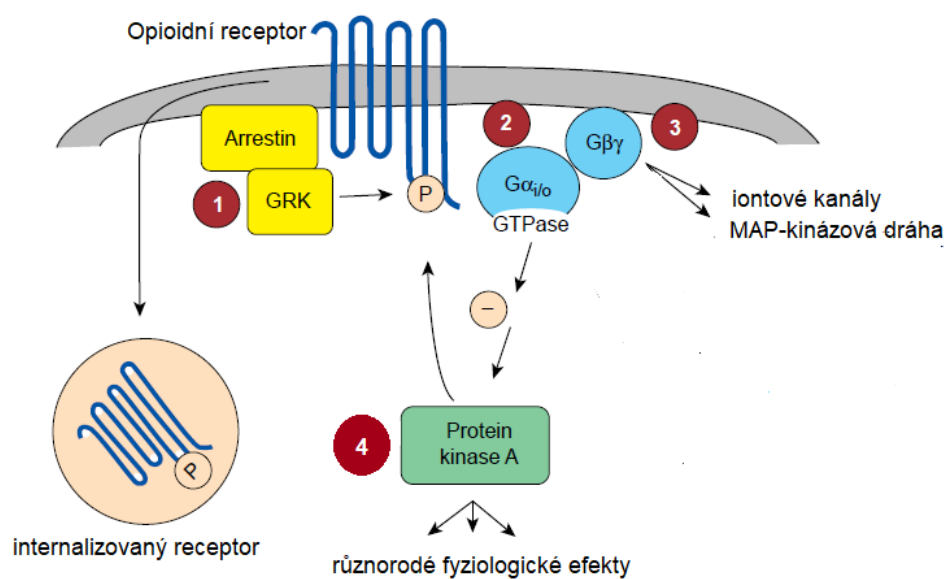
Molekulární a buněčné adaptace po vystavení opioidům

Při chronické stimulaci OR opioidy v nich indukují adaptivní změny. Dochází ke snížení akutní receptorové odezvy. Tyto adaptivní změny jsou nutné kvůli ochraně buňky proti hyperstimulaci. V důsledku adaptivních změn se rozvíjí desensitizace, internalizace, rezistence nebo down-regulace OR. Všechny tyto procesy vedou k oslabení farmakologické aktivity opioidních látek, která je pozorovaná při dlouhodobém podávání (Browne et al., 2020).

Dochází k up-regulaci cAMP signální dráhy (Nestler; Aghajanian, 1997). Chronické užívání opiátů vede ke zvýšení exprese AC, tudíž i následné zvýšené produkci cAMP a PKA, která je na něm závislá. Tyto změny ve fosforylaci CREB proteinkinázou A mohou vést ke změně genové exprese, která je zodpovědná za reakce charakteristické pro fyzickou závislost a abstinenci syndrom (Shaw-Lutchman et al., 2002). Up-regulace cAMP signální dráhy v LC přispívá k formování rysů závislosti a abstinenci syndromu (Nestler; Aghajanian, 1997).

Chronické působení opioidů vede jako u akutní expozice ke zvýšení aktivity GRK kinázy a dochází k vazbě β -arrestinu-1 / β -arrestinu-2 se projeví inaktivací receptoru (Fan et al., 2003). Na obrázku 8 je znázorněno schéma, které

ilustruje možné mechanismy indukované drogou, které působí změny v opioidních receptorech.



Obrázek 8: Schéma ilustrující možné mechanismy drogou indukovaných změn v opioidních receptorech. GRK - G protein-coupled receptor kinase (upraveno podle Nestler; Aghajanian, 1997)

4. Role epigenetických mechanismů v opiátové závislosti

Užívání opioidních substancí vede k dlouhodobým změnám v mesolimbickém dopaminergním systému. Perzistence těchto neuroadaptací je částečně zprostředkována epigenetickými modifikacemi, které mění genovou expresi. Opioidy indukované epigenetické modifikace mohou vyvolávat změny v neuroplasticitě, strukturní a behaviorální změny (Nestler, 2014).

4.1 Vliv opioidů na genovou expresi

Opakované vystavení organismu opioidům mění zaběhnuté epigenetické modifikace v nervových buňkách v CNS a způsobuje dlouhodobé změny transkripční a buněčné aktivity. Organismus vystavený opioidům vykazuje vyšší úroveň permissivní acetylce histonů, nižší úroveň represivní metylace histonů a změny ve vzorcích DNA metylace a nekódující RNA v mesolimbickém dopaminergním a limbickém systému. Potvrzuje se kauzalita mezi drogami indukovanými epigenetickými modifikacemi a abnormálním chováním závislých jedinců (Robison et al., 2011; Jaenisch et al., 2003). Opakované užívání drog způsobuje buněčné adaptace ve specifické populaci neuronů, které vedou nakonec ke stavu závislosti - u opiátů je to hlavně NAc, VTA. Tyto změny vedou k intenzivnějším behaviorálním reakcím na opioidy. Takové změny jsou pravděpodobně zprostředkovány vyššími hladinami transkripční aktivity v genech kritických pro neuroplasticitu a synaptickou fyziologii, které jsou základem závislosti, jež podporují abnormality v chování (Robison et al., 2011; Jaenisch et al., 2003).

4.1.1 Acetylce histonů

Opioidy vyvolávají zvýšenou hladinu acetylce. Acetylce, popřípadě fosfoacetylce, udílí chromatinu rozvolněný charakter, tudíž dochází ke zvýšení genové exprese. Pozměněná transkripční aktivita ovlivňuje synaptickou plasticitu a dysregulaci neurotransmise v dané části mozku a behaviorální změny závislého jedince (Egervari et al., 2017; Sheng et al., 2011; W. S. Chen et al., 2016).

Chronické užívání heroinu vede ke zvýšené fosfoacetylaci H3 v NAc (Sheng et al., 2011), hyperacetylaci H3K18, H4K5 a H4K8 ve dřeni a plášti NAc (W. S. Chen et al., 2016). Rozsáhlá studie věnující se chronickému užívání heroinu ukázala zvýšenou úroveň acetylce ve velké míře na H3K27, v menší míře pak na H3K23 ve striatu (Egervari et al., 2017). V důsledku rozvolnění chromatinu, dochází ke zvýšené transkripci genu *GRIA1*, který je zapojen do procesu nutkavého chování při vyhledávání další dávky drogy. Stupeň acetylce histonů koreluje s délkou a intenzitou užívání heroinu (Egervari et al., 2017; Bossert et al., 2012).

Po dlouhodobém užívání morfinu dochází k hyperacetylaci H3K14 v bazolaterální části amygdaly. To způsobuje nadměrnou expresi genů pro BDNF, Δ FosB a aktivaci CREB. Nadále zapříčiňuje hyperacetylaci na H3K9, H3K14 v LC a VTA. Dochází k upregulaci exprese genů pro TH (tyrosin hydroxyláza), která má zásadní roli v molekulárních adaptacích při chronickém podávání opiátů v LC a VTA

a přispívá k fyzickým projevům abstinenčního syndromu (Mashayekhi; Rasti; Khoshdel et al., 2018).

Transkripční faktory podílející se na vzniku tolerance a udržení závislosti

Epigenetické změny se opírají o aktivaci intracelulárních drah, které jsou indukované opioidy. Intracelulární dráhy spojují synaptickou aktivitu s transkripční regulací pomocí downstream aktivace TF. TF jsou proteiny, které se přímo vážou na sekvenci DNA specifickým způsobem. Takto vývoj a exprese epigenetických změn závisí na iterační interakcích mezi intracelulární signální kaskádou a epigenetickými značkami (Browne et al., 2020).

Výše zmíněný Δ FosB je transkripční faktor, který hraje klíčovou roli v behaviorálních reakcích na opiáty. Studie ukazují, že by mohl fungovat jako trvalý molekulární přepínač, který přispívá ke stavu závislosti (Zachariou et al., 2006). Jeho nadměrná exprese zintenzivňuje potřebu prožít znovu euforický stav po požití drogy. Tento stav je indukován opioidními substancemi (např. morfin, heroin), obzvláště v NAc a dorzální části striata. To vede k prohloubení fyzické a psychické závislosti a ke zrychlenému rozvoji tolerance. Přetrvává v mozku značnou dobu, může to být několik týdnů až měsíců a udržuje nastalé transkripční změny dlouho po poslední expozici drogám (Zachariou et al., 2006).

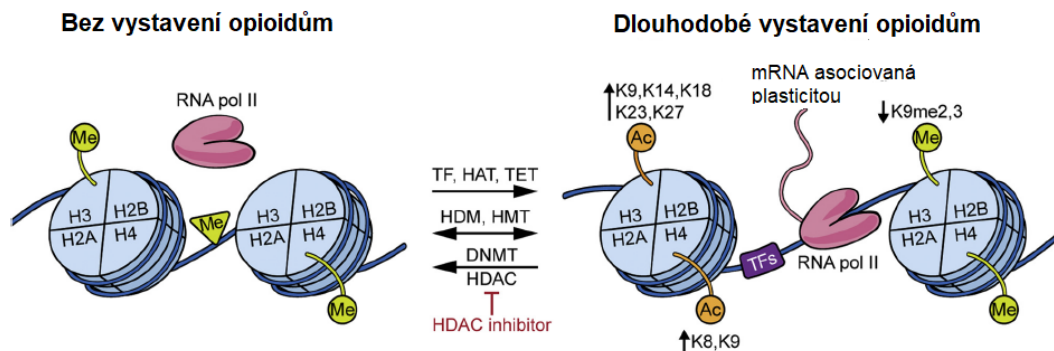
Dalším rozhodujícím regulátorem transkripce je CREB. Je jaderným proteinem, který ovlivňuje genovou expresi. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} nebo cAMP může vyvolat jeho fosforylaci a aktivaci (Carlezon et al., 2005). Ve spojitosti s opioidy byl CREB studován v LC, což je oblast mozku spojená s fyzickou závislostí na opiátech a následným abstinenčním syndromem po odejmutí drogy (Carlezon et al., 2005). CREB například indukuje expresi genů pro TH v LC. TH je enzym regulující rychlost syntézy DA a NA, tudíž při zvýšené expresi TH se zrychluje syntéza NA a DA. Zvýšená neurotransmise NA v LC způsobuje fyzické abstinenční příznaky (Mashayekhi; Rasti; Khoshdel et al., 2018). Jiné studie ukazují, že chronické užívání morfinu zvyšuje aktivitu CREB v NAc snižuje morfinem vyvolané euforické stavy, což může být jeden z mechanismů nastávající tolerance k opioidním látkám (Barrot et al., 2002).

Společně tyto studie poskytují důkaz, že opioidy podporují rozvolněný stav chromatinu. Dochází k vyšší transkripční aktivitě, která je kritická pro expresi genů související s plasticitou. Průběh acetylace histonů je znázorněn na obrázku 9.

4.1.2 Metylace histonů

Poznatky o metylaci histonů při působení opiátů nejsou prozkoumány v takové míře jako např. acetylace histonů. Chronickým užíváním opioidních substancí se snižuje dimethylace, která má v tomto případě represivní účinky na genovou expresi (M. Chen et al., 2019; Sun et al., 2012; Mashayekhi; Rasti; Rahvar et al., 2012). Dimetylaci zajišťují HMT, kdy na imino skupinu N-terminálního konce přidávají dvě metylové skupiny.

Opakované podávání morfinu snižuje dimetylaci H3K9 (H3K9me2) v NAc (M. Chen et al., 2019) a v jádru amygdaly (Zhang; Tao et al., 2014) ale nikoliv monometylce, či trimetylce. H3K9me2 pravděpodobně podporuje transkripční aktivitu a působí neurální a behaviorální adaptace. Po vystavení morfinu klesá



Obrázek 9: Modifikace histonů před a po vystavení opioidům - Ac - acetylce; Me - metylce; mRNA - messenger RNA (upraveno podle Browne et al., 2020)

dimetylce na H3K9me2 a H3K4, čímž se zvyšuje transkripční aktivita především na promotoru genu Δ FosB ve striatu (M. Chen et al., 2019). Zvýšená trimetylce H3K9 ve VTA a LC se projevuje až po vysazení drogy (Mashayekhi; Rasti; Rahvar et al., 2012). Na obrázku 9 je schématicky znázorněna metylce histonů po chronické expozici opioidům.

4.1.3 Metylce DNA

Metylce DNA, 5mC, primárně probíhá na CG dinukleotidech a obecně převádí geny do umlčeného stavu, protože fyzicky brání přístupu RNA polymerázy II a transkripci těchto genů. Alternativní forma DNA metylce 5hmC, na kterou je mozek bohatý, koreluje častěji transkripční aktivací (Barrow et al., 2017).

Preklinické studie genové exprese prokázaly značné transkripční změny v NAc, striatu při chronickém užívání morfinu (Albertson et al., 2006; Piechota et al., 2012), včetně genů, které jsou spojené s cirkadiálními rytmy, uvolňováním neurotransmiterů a glukokortikoidů. Pacienti dlouhodobě léčení opioidními analgetiky vykazují stejné změny v metylaci DNA jako jedinci závislí na heroinu nebo morfinu (Doehring et al., 2013; Chidambaran et al., 2017).

Chronická expozice morfinu přináší výrazné snížení hladiny 5mC v superior colliculus a zvýšení hladiny 5mC v hypothalamu. Dlouhodobé podávání morfinu je také spojeno s výrazným zvýšením hladiny 5hmC v mozkové kůře a hipokampu. K dramatickému snížení hladiny 5hmC dochází v oblasti mesencephalonu (Barrow et al., 2017). Tyto výsledky ukazují, že epigenetické modifikace jsou specificky lokalizované. Metylce probíhá na genech pro BDNF, COMT (catechol-O-metyltransferáza) a IL-6 (interleukin - 6) po expozici morfinu v oblasti inferioru mesencephalonu (Barrow et al., 2017). Exprese BDNF usnadňuje opiáty asociovanou neurální plasticitu (Akbarian et al., 2002) a dopamin dependentní odpověď na opioidy (Vargas-Perez et al., 2009). COMT je zapojená do eliminace dopaminu a její snížená exprese by mohla odpovídat zvýšené dopaminové signalizaci.

Makrofágy v mikrogliích v CNS produkují prozánětlivé cytokiny, jako je interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) a TNF- α . Metylce na promotoru pro IL-6 se zvýšila v mikrogliích. Makrofágy produkují prozánětlivé cytokiny - interleukin 1b (IL-1b), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis faktor α (TNF- α), které jsou indukovány morfinem (Hutchinson et al., 2008).

4.1.4 Nekódující RNA

Genová exprese je regulována i na úrovni transkripce a translace nekódujících RNA, včetně miRNA a lncRNA. Po expozici opioidům se mění aktivita miRNA. Nekódující RNA se tak jeví jako důležitý regulátor transkripční aktivity v opiatové závislosti.

Fentanyl snižuje transkripci genu *talin2* a buněčnou hladinu miR-190 v oblasti hipokampu. U morfinu toto snížení nebylo pozorováno (Zheng et al., 2012). Například morfinem indukovaná up-regulace miR-15b v lidských makrofázích (Dave et al., 2010), zatímco hladina miR-133b byla snížena morfinem indukované expozici v embryích *Danio rerio* (Sanchez-Simon et al., 2010). MiR let-7 byl identifikován jako kritický regulátor pro lidský i myší μ OR. Navíc bylo prokázáno, že je relevantní jak pro buněčnou toleranci opioidů, tak pro zvířecí modely opioidní tolerance (He et al., 2012). Let-7 představuje jeden z několika miR přispívajících k opioidní toleranci.

V této oblasti epigenetických modifikací indukovaných opioidy toho ještě není mnoho známo a k pochopení je zapotřebí více studií o funkčních důsledcích těchto epigenetických změn.

Závěr

Tato bakalářská práce shrnuje vlivy epigenetických mechanismů v rozvoji a udržování opiátové závislosti. Opioidy se primárně využívají jako analgetika, ale jsou často zneužívány pro své psychotropní účinky. Chronické užívání vede k rozvoji závislosti a tolerance. Opioidní substance působí v oblasti mesolimbického systému, hlavně ve ventrální tegmentální oblasti, nucleus accumbens a prefrontálním kortexu. Klíčovým neurotransmiterem je zde dopamin, který působí v nucleus accumbens a uvádí uživatele drogy do euforických stavů a celkového tělesného zklidnění. Tyto stavy mohou být důvodem v raných stádiích závislosti pro opakované užití drogy.

Během chronického užívání opioidních drog dochází ke změně v epigenetických modifikacích. Dochází ke zvýšené acetylaci na histonech H3K9, H3K14, H3K18, H3K23, H3K27, H4K5 a H4K8 v oblasti mesolimbického systému. Hyperacetylace na konkrétních lysinových zbytcích histonů H3 a H4 podporuje otevřenější stav chromatinu pro geny, které se podílejí na vzniku a udržování závislosti. Dlouhodobé užívání opioidů vede ke snížení dimethylace, která má represivní účinek na genovou transkripci. Snížení dimethylace probíhá na histonech H3K9 a H3K4. Další epigenetickou modifikací je metylace DNA - 5mC. DNA metylace uvádí chromatin do umlčeného stavu. Naopak alternativní forma DNA metylace 5hmC, koreluje s transaktivací. Chronická expozice opioidům přináší výrazné snížení hladiny 5mC v superior colliculus a zvýšení hladiny 5mC v hypothalamu. Dlouhodobé podávání morfinu je také spojeno s výrazným zvýšením hladiny 5hmC v mozkové kůře a hipokampu. K dramatickému snížení hladiny 5hmC dochází v oblasti mesencephalonu.

Genová exprese je regulována i na úrovni transkripce a translace nekódujících RNA, včetně miRNA a lncRNA. Po expozici opioidům se mění aktivita miRNA. Nekódující RNA se tak jeví jako důležitý regulátor transkripční aktivity v opiátové závislosti.

Seznam použité literatury

- AAPOLA, U.; KAWASAKI, K.; SCOTT, H. S.; OLLILA, J.; VIHINEN, M.; HEINO, M.; SHINTANI, A.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.; KROHN, K.; ANTONARAKIS, S. E.; SHIMIZU, N.; KUDOH, J.; PETERSON, P., 2000. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics*. Sv. 65, s. 293–298.
- AKBARIAN, S.; RIOS, M.; LIU, R. J.; GOLD, S. J.; FONG, H. F.; ZEILER, S.; COPPOLA, V.; TESSAROLLO, L.; JONES, K. R.; NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K.; JAENISCH, R., 2002. Brain-derived neurotrophic factor is essential for opiate-induced plasticity of noradrenergic neurons. *The Journal of Neuroscience*. Sv. 22, s. 4153–4162.
- ALBERTSON, D. N.; SCHMIDT, C. J.; KAPATOS, G.; BANNON, M. J., 2006. Distinctive profiles of gene expression in the human nucleus accumbens associated with cocaine and heroin abuse. *Neuropsychopharmacology*. Sv. 31, s. 2304–2312.
- ARAN, D.; TOPEROFF, G.; ROSENBERG, M.; HELLMAN, A., 2011. Replication timing-related and gene body-specific methylation of active human genes. *Human Molecular Genetics*. Sv. 20, s. 670–680.
- ARENTS, G.; BURLINGAME, R. W.; WANG, B. C.; LOVE, W. E.; MOUDRIANAKIS, E. N., 1991. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Sv. 88, s. 10148–10152.
- ARENTS, G.; MOUDRIANAKIS, E. N., 1995. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Sv. 92, s. 11170–11174.
- AVERY, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M., 1944. Studies in the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus type III*. *Journal of Experimental Medicine*. Sv. 79, s. 137–158.
- BANNISTER, A. J.; ZEGERMAN, P.; PARTRIDGE, J. F.; MISKA, E. A.; THOMAS, J. O.; ALLSHIRE, R. C.; KOUZARIDES, T., 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*. Sv. 410, s. 120–124.
- BARROT, M.; OLIVIER, J. D.; PERROTTI, L. I.; DILEONE, R. J.; BERTON, O.; EISCH, A. J.; IMPEY, S.; STORM, D. R.; NEVE, R. L.; YIN, J. C.; ZACHARIOU, V.; NESTLER, E. J., 2002. CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Sv. 99, s. 11435–11440.

- BARROW, T. M.; BYUN, H. M.; LI, X.; SMART, C.; WANG, Y. X.; ZHANG, Y.; BACCARELLI, A. A.; GUO, L., 2017. The effect of morphine upon DNA methylation in ten regions of the rat brain. *Epigenetics*. Sv. 12, s. 1038–1047.
- BEECHER, H. K., 1946. Pain in Men Wounded in Battle. *Annals of Surgery*. Sv. 123, s. 96–105.
- BLAKEMORE, P. R.; WHITE, J. D., 2002. Morphine, the Proteus of organic molecules. *Chemical Communications*. Sv. 11, s. 1159–1168.
- BOSSERT, J. M.; STERN, A. L.; THEBERGE, F. R.; MARCHANT, N. J.; WANG, H. L.; MORALES, M.; SHAHAM, Y., 2012. Role of projections from ventral medial prefrontal cortex to nucleus accumbens shell in context-induced reinstatement of heroin seeking. *Journal of Neuroscience Research*. Sv. 32, s. 4982–4991.
- BRAMI-CHERRIER, K.; LAVAU, J.; PAGÉS, C.; ARTHUR, J. S.; CABOCHE, J., 2007. Glutamate induces histone H3 phosphorylation but not acetylation in striatal neurons: role of mitogen- and stress-activated kinase-1. *Journal of Neurochemistry*. Sv. 101, s. 697–708.
- * BROWNE, C. J.; GODINO, A.; SALERY, M.; NESTLER, E. J., 2020. Epigenetic Mechanisms of Opioid Addiction. *Biological Psychiatry*. Sv. 87, s. 22–33.
- * CARLEZON, W. A.; DUMAN, R. S.; NESTLER, E. J., 2005. The many faces of CREB. *Trends in Neurosciences*. Sv. 28, s. 436–445.
- CASPARY, T.; CLEARY, M. A.; BAKER, C. C.; GUAN, X. J.; TILGHMAN, S. M., 1998. Multiple mechanisms regulate imprinting of the mouse distal chromosome 7 gene cluster. *Molecular and Cellular Biology*. Sv. 18, s. 3466–3474.
- DAVE, R. S.; KHALILI, K., 2010. Morphine treatment of human monocyte-derived macrophages induces differential miRNA and protein expression: impact on inflammation and oxidative stress in the central nervous system. *Journal of Cellular Biochemistry*. Sv. 110, s. 834–845.
- DEATON, A. M.; BIRD, A., 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*. Sv. 25, s. 1010–1022.
- DINCER, Y., 2016. Epigenetics: Mechanisms and Clinical Perspectives. In: Nova Science Publishers, Incorporated, s. 3. Genetics - Research and Issues.
- DOEHRING, A.; OERTEL, B. G.; SITTL, R.; LÖTSCH, J., 2013. Chronic opioid use is associated with increased DNA methylation correlating with increased clinical International Association for the Study of Pain. *International Association for the Study of Pain*. Sv. 154, s. 15–23.
- DOLE, V. P.; NYSWANDER, M. E., 1967. Heroin addiction—a metabolic disease. *Archives of Internal Medicine*. Sv. 120, s. 19–24.
- * DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A., 2009. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. *Seminars in Reproductive Medicine*. Sv. 27, s. 351–357.

- EGERVARI, G.; LANDRY, J.; CALLENS, J.; FULLARD, J. F.; ROUSSOS, P.; KELLER, E.; HURD, Y. L., 2017. Striatal H3K27 Acetylation Linked to Glutamatergic Gene Dysregulation in Human Heroin Abusers Holds Promise as Therapeutic Target. *Biological Psychiatry*. Sv. 81, s. 585–594.
- FAN, X. L.; ZHANG, J. S.; ZHANG, X. Q.; YUE, W.; MA, L., 2003. Differential regulation of beta-arrestin 1 and beta-arrestin 2 gene expression in rat brain by morphine. *Neuroscience*. Sv. 117, s. 383–389.
- FLEMING, L. M.; PONJEE, G.; CHILDERS, S. R., 1992. Inhibition of protein phosphorylation by opioid-inhibited adenylyl cyclase in rat brain membranes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Sv. 260, s. 1416–1424.
- GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*. Sv. 196, s. 261–282.
- GOODMAN, O. B.; KRUPNICK, J. G.; SANTINI, F.; GUREVICH, V. V.; PENN, R. B.; GAGNON, A. W.; KEEN, J. H.; BENOVIĆ, J. L., 1998. Role of arrestins in G-protein-coupled receptor endocytosis. *Advances in Pharmacology and Pharmacy*. Sv. 42, s. 429–433.
- GOTO, K.; NUMATA, M.; KOMURA, J. I.; ONO, T.; BESTOR, T. H.; KONDO, H., 1994. Expression of DNA methyltransferase gene in mature and immature neurons as well as proliferating cells in mice. *Differentiation*. Sv. 56, s. 39–44.
- GUAN, Z.; GIUSTETTO, M.; LOMVARDAS, S.; KIM, J. H.; MINIACI, M. C.; SCHWARTZ, J. H.; THANOS, D.; KANDEL, E. R., 2002. Integration of long-term-memory-related synaptic plasticity involves bidirectional regulation of gene expression and chromatin structure. *Cell*. Sv. 111, s. 483–493.
- GUO, J. U.; SU, Y.; ZHONG, C.; MING, G. L.; SONG, H., 2011. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*. Sv. 145, s. 423–434.
- HATA, K.; OKANO, M.; LEI, H.; LI, E., 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*. Sv. 129, s. 1983–1993.
- HE, Y.; WANG, Z. J., 2012. Let-7 microRNAs and Opioid Tolerance. *Frontiers in Genetics*. Sv. 3, s. 110.
- HELLMAN, A.; CHESS, A., 2007. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*. Sv. 315, s. 1141–1143.
- HERMANN, A.; GOYAL, R.; JELTSCH, A., 2004. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *Journal of Biological Chemistry*. Sv. 279, s. 48350–48359.
- HUANG, Y.; FANG, J.; BEDFORD, M. T.; ZHANG, Y.; XU, R. M., 2006. Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science*. Sv. 312, s. 748–751.

- HUTCHINSON, M. R.; COATS, B. D.; LEWIS, S. S.; ZHANG, Y.; SPRUNGER, D. B.; REZVANI, N.; BAKER, E. M.; JEKICH, B. M.; WIESELER, J. L.; SOMOGYI, A. A.; MARTIN, D.; POOLE, S.; JUDD, C. M.; MAIER, S. F.; WATKINS, L. R., 2008. Proinflammatory cytokines oppose opioid-induced acute and chronic analgesia. *Brain, Behavior, and Immunity*. Sv. 22, s. 1178–1189.
- CHAKRABARTI, S.; CHANG, A.; LIU, N. J.; GINTZLER, A. R., 2016. Chronic opioid treatment augments caveolin-1 scaffolding: relevance to stimulatory μ -opioid receptor adenylyl cyclase signaling. *Journal of Neurochemistry*. Sv. 139, s. 737–747.
- CHEN, M.; ZHANG, X.; HAO, W., 2019. H3K4 dimethylation at FosB promoter in the striatum of chronic stressed rats promotes morphine-induced conditioned place preference. *PLoS One*. Sv. 14, s. e0221506.
- CHEN, W. S.; XU, W. J.; ZHU, H. Q.; GAO, L.; LAI, M. J.; ZHANG, F. Q.; ZHOU, W. H.; LIU, H. F., 2016. Effects of histone deacetylase inhibitor sodium butyrate on heroin seeking behavior in the nucleus accumbens in rats. *Brain Research*. Sv. 1652, s. 151–157.
- CHERNY, N. I.; FALLON, M.; KAASA, S.; PORTENOY, R. K.; CURROW, D., 2015. Oxford textbook of palliative medicine. In: Oxford University Press, USA, s. 409. 5th edition.
- CHIDAMBARAN, V.; ZHANG, X.; MARTIN, L. J.; DING, L.; WEIRAUCH, M. T.; GEISLER, K.; STUBBEMAN, B. L.; SADHASIVAM, S.; JI, H., 2017. DNA methylation at the mu-1 opioid receptor gene (OPRM1) promoter predicts preoperative, acute, and chronic postsurgical International Association for the Study of Pain after spine fusion. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. Sv. 10, s. 157–168.
- * INTURRISI, C. E., 2002. Clinical pharmacology of opioids for pain. *The Clinical Journal of Pain*. Sv. 18, s. 3–13.
- ISELL, H.; FRASER, H. F., 1950. Addiction to analgesics and barbiturates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Sv. 99, s. 355–397.
- ITO, S.; SHEN, L.; DAI, Q.; WU, S. C.; COLLINS, L. B.; SWENBERG, J. A.; HE, C.; ZHANG, Y., 2011. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*. Sv. 333, s. 1300–1303.
- * JAENISCH, R.; BIRD, A., 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*. Sv. 33, s. 245–254.
- KAWAGUCHI, Y.; KOVACS, J. J.; MCLAURIN, A.; VANCE, J. M.; ITO, A.; YAO, T. P., 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*. Sv. 115, s. 727–738.
- KOSTEN, T. R.; GEORGE, T. P., 2002. The neurobiology of opioid dependence: implications for treatment. *Science & Practice Perspectives*. Sv. 1, s. 13–20.
- * KOUZARIDES, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*. Sv. 128, s. 693–705.

- KOVACHEVA, V. P.; MELLOTT, T. J.; DAVISON, J. M.; WAGNER, N.; LOPEZ-COVIELLA, I.; SCHNITZLER, A. C.; BLUSZTAJN, J. K., 2007. Gestational choline deficiency causes global and Igf2 gene DNA hypermethylation by up-regulation of Dnmt1 expression. *Journal of Biological Chemistry*. Sv. 282, s. 31777–31788.
- KÜHN, S.; GALLINAT, J., 2012. The neural correlates of subjective pleasantness. *NeuroImage*. Sv. 61, s. 289–294.
- LACHNER, M.; O'CARROLL, D.; REA, S.; MECHTLER, K.; JENUWEIN, T., 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. Sv. 410, s. 116–120.
- LANE-LADD, S. B.; PINEDA, J.; BOUNDY, V. A.; PFEUFFER, T.; KRUPINSKI, J.; AGHAJANIAN, G. K.; NESTLER, E. J., 1997. CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *The Journal of Neuroscience*. Sv. 17, s. 7890–7901.
- LAPLANT, Q.; VIALOU, V.; COVINGTON, H. E.; DUMITRIU, D.; FENG, J.; WARREN, B. L.; MAZE, I.; DIETZ, D. M.; WATTS, E. L.; I?IGUEZ, S. D.; KOO, J. W.; MOUZON, E.; RENTHAL, W.; HOLLIS, F.; WANG, H.; NOONAN, M. A.; REN, Y.; EISCH, A. J.; BOLA?OS, C. A.; KABBAJ, M.; XIAO, G.; NEVE, R. L.; HURD, Y. L.; OOSTING, R. S.; FAN, G.; MORRISON, J. H.; NESTLER, E. J., 2010. Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*. Sv. 13, s. 1137–1143.
- LAW, P.Y.; LOH, H. H., 2004. Opioid Receptors. In: *Opioid Receptors. Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier, s. 167–171.
- * LE MERRER, J.; BECKER, J. A.; BEFORT, K.; KIEFFER, B. L., 2009. Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiological Reviews*. Sv. 89, s. 1379–1412.
- LEE, M. S.; JUN, D. H.; HWANG, C. I.; PARK, S. S.; KANG, J. J.; PARK, H. S.; KIM, J.; KIM, J. H.; SEO, J. S.; PARK, W. Y., 2006. Selection of neural differentiation-specific genes by comparing profiles of random differentiation. *Stem Cells*. Sv. 24, s. 1946–1955.
- LICCIARDELLO, M. P.; KUBICEK, S., 2016. Targeting Histone Methylation: The Development of Selective Methyltransferase and Demethylase Inhibitors. In: *Targeting Histone Methylation: The Development of Selective Methyltransferase and Demethylase Inhibitors. Drug Discovery in Cancer Epigenetics*. Elsevier, s. 209–238.
- * LISTOS, J.; ŁUPINA, M.; TALAREK, S.; MAZUR, A.; ORZELSKA-GÓRKA, J.; KOTLIŃSKA, J., 2019. The Mechanisms Involved in Morphine Addiction: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences*. Sv. 20, s. 1–14.
- LORD, J. A.; WATERFIELD, A. A.; HUGHES, J.; KOSTERLITZ, H. W., 1977. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*. Sv. 267, s. 495–499.

- LUGER, K.; MADER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. Sv. 389, s. 251–260.
- * MARMORSTEIN, R., 2001. Structure and function of histone acetyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Sv. 58, s. 693–703.
- MASHAYEKHI, F. J.; RASTI, M.; KHOSHDEL, Z.; OWJI, A. A., 2018. Expression Levels of the Tyrosine Hydroxylase Gene and Histone Modifications Around its Promoter in the Locus Coeruleus and Ventral Tegmental Area of Rats during Forced Abstinence from Morphine. *European Addiction Research*. Sv. 24, s. 304–311.
- MASHAYEKHI, F. J.; RASTI, M.; RAHVAR, M.; MOKARRAM, P.; NAMAVAR, M. R.; OWJI, A. A., 2012. Expression levels of the BDNF gene and histone modifications around its promoters in the ventral tegmental area and locus ceruleus of rats during forced abstinence from morphine. *Neurochemical Research*. Sv. 37, s. 1517–1523.
- MATTHES, H. W.; MALDONADO, R.; SIMONIN, F.; VALVERDE, O.; SLOWE, S.; KITCHEN, I.; BEFORT, K.; DIERICH, A.; LE MEUR, M.; DOLLÉ, P.; TZAVARA, E.; HANOUNE, J.; ROQUES, B. P.; KIEFFER, B. L., 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -opioid-receptor gene. *Nature*. Sv. 383, s. 819–823.
- * MAZE, I.; NOH, K. M.; ALLIS, C. D., 2013. Histone regulation in the CNS basic principles of epigenetic plasticity. *Neuropsychopharmacology*. Sv. 38, s. 3–22.
- MICHAN, S.; SINCLAIR, D., 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochemical Journal*. Sv. 404, s. 1–13.
- * MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G., 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. Sv. 38, s. 23–38.
- * MORRIS, A. J.; MALBON, C. C., 1999. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiological Reviews*. Sv. 79, s. 1373–1430.
- MOSS, T.; STEPHENS, R. M.; CRANE-ROBINSON, C.; BRADBURY, E. M., 1977. A nucleosome-like structure containing DNA and the arginine-rich histones H3 and H4. *Nucleic Acids Research*. Sv. 4, s. 2477–2485.
- * NESTLER, E. J., 1994. Molecular neurobiology of drug addiction. *Neuropsychopharmacology*. Sv. 11, s. 77–87.
- * NESTLER, E. J., 2014. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*. Sv. 76 Pt B, s. 259–268.
- * NESTLER, E. J.; AGHAJANIAN, G. K., 1997. Molecular and cellular basis of addiction. *Science*. Sv. 278, s. 58–63.
- OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. Sv. 99, s. 247–257.

- PIECHOTA, M.; KOROSTYNSKI, M.; SIKORA, M.; GOLDA, S.; DZBEK, J.; PRZEWLOCKI, R., 2012. Common transcriptional effects in the mouse striatum following chronic treatment with heroin and methamphetamine. *Genes, Brain and Behavior*. Sv. 11, s. 404–414.
- PITTENGER, C.; KANDEL, E. R., 2003. In search of general mechanisms for long-lasting plasticity: Aplysia and the hippocampus. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. Sv. 358, s. 757–763.
- RAI, K.; HUGGINS, I. J.; JAMES, S. R.; KARPFF, A. R.; JONES, D. A.; CAIRNS, B. R., 2008. DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell*. Sv. 135, s. 1201–1212.
- RAKYAN, V. K.; HILDMANN, T.; NOVIK, K. L.; LEWIN, J.; TOST, J.; COX, A. V.; ANDREWS, T. D.; HOWE, K. L.; OTTO, T.; OLEK, A.; FISCHER, J.; GUT, I. G.; BERLIN, K.; BECK, S., 2004. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: a pilot study for the human epigenome project. *PLoS Biology*. Sv. 2, s. e405.
- RAMESH, D.; ROSS, G. R.; SCHLOSBERG, J. E.; OWENS, R. A.; ABDULLAH, R. A.; KINSEY, S. G.; LONG, J. Z.; NOMURA, D. K.; SIMSELLEY, L. J.; CRAVATT, B. F.; AKBARALI, H. I.; LICHTMAN, A. H., 2011. Blockade of endocannabinoid hydrolytic enzymes attenuates precipitated opioid withdrawal symptoms in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Sv. 339, s. 173–185.
- RENTHAL, W.; NESTLER, E. J., 2009. Histone acetylation in drug addiction. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Sv. 20, s. 387–394.
- * ROBISON, A. J.; NESTLER, E. J., 2011. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature Reviews Neuroscience*. Sv. 12, s. 623–637.
- ROMO, R.; SCHULTZ, W., 1990. Dopamine neurons of the monkey midbrain: contingencies of responses to active touch during self-initiated arm movements. *Journal of Neurophysiology*. Sv. 63, s. 592–606.
- * SALINAS, R. D.; CONNOLLY, D. R.; SONG, H., 2020. Invited Review: Epigenetics in neurodevelopment. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. Sv. 46, s. 6–27.
- SANCHEZ-SIMON, F. M.; ZHANG, X. X.; LOH, H. H.; LAW, P. Y.; RODRIGUEZ, R. E., 2010. Morphine regulates dopaminergic neuron differentiation via miR-133b. *Molecular Pharmacology*. Sv. 78, s. 935–942.
- SAXONOV, S.; BERG, P.; BRUTLAG, D. L., 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Sv. 103, s. 1412–1417.
- SHAFFER, Steven L.; FLOOD, Pamela, 2008. The pharmacology of opioids. In: *The pharmacology of opioids. Geriatric anesthesiology*. Springer, s. 209–228.
- SHARMA, S. K.; KLEE, W. A.; NIRENBERG, M., 1977. Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Sv. 74, s. 3365–3369.

- SHAW-LUTCHMAN, T. Z.; BARROT, M.; WALLACE, T.; GILDEN, L.; ZACHARIOU, V.; IMPEY, S.; DUMAN, R. S.; STORM, D.; NESTLER, E. J., 2002. Regional and cellular mapping of cAMP response element-mediated transcription during naltrexone-precipitated morphine withdrawal. *Journal of Neuroscience Research*. Sv. 22, s. 3663–3672.
- SHENG, J.; LV, Z. g.; WANG, L.; ZHOU, Y.; HUI, B., 2011. Histone H3 phosphoacetylation is critical for heroin-induced place preference. *NeuroReport*. Sv. 22, s. 575–580.
- SIMPSON, R. T., 1978. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry*. Sv. 17, s. 5524–5531.
- * STRUHL, K., 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & Development*. Sv. 12, s. 599–606.
- SUN, H.; MAZE, I.; DIETZ, D. M.; SCOBIE, K. N.; KENNEDY, P. J.; DAMEZ-WERNO, D.; NEVE, R. L.; ZACHARIOU, V.; SHEN, L.; NESTLER, E. J., 2012. Morphine epigenomically regulates behavior through alterations in histone H3 lysine 9 dimethylation in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience Research*. Sv. 32, s. 17454–17464.
- SZULWACH, K. E.; LI, X.; LI, Y.; SONG, C. X.; WU, H.; DAI, Q.; IRIER, H.; UPADHYAY, A. K.; GEARING, M.; LEVEY, A. I.; VASANTHAKUMAR, A.; GODLEY, L. A.; CHANG, Q.; CHENG, X.; HE, C.; JIN, P., 2011. 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nature Neuroscience*. Sv. 14, s. 1607–1616.
- TAHILIANI, M.; KOH, K. P.; SHEN, Y.; PASTOR, W. A.; BANDUKWALA, H.; BRUDNO, Y.; AGARWAL, S.; IYER, L. M.; LIU, D. R.; ARAVIND, L.; RAO, A., 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethyl-cytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. Sv. 324, s. 930–935.
- TAVERNA, S. D.; ILIN, S.; ROGERS, R. S.; TANNY, J. C.; LAVENDER, H.; LI, H.; BAKER, L.; BOYLE, J.; BLAIR, L. P.; CHAIT, B. T.; PATEL, D. J.; AITCHISON, J. D.; TACKETT, A. J.; ALLIS, C. D., 2006. Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Molecular Cell*. Sv. 24, s. 785–796.
- VARGAS-PEREZ, H.; TING-A KEE, R.; WALTON, C. H.; HANSEN, D. M.; RAZAVI, R.; CLARKE, L.; BUFALINO, M. R.; ALLISON, D. W.; STEFFENSEN, S. C.; KOOY, D. van der, 2009. Ventral tegmental area BDNF induces an opiate-dependent-like reward state in naive rats. *Science*. Sv. 324, s. 1732–1734.
- WANG, Y.; LAI, J.; CUI, H.; ZHU, Y.; ZHAO, B.; WANG, W.; WEI, S., 2015. Inhibition of histone deacetylase in the basolateral amygdala facilitates morphine context-associated memory formation in rats. *Journal of Molecular Neuroscience*. Sv. 55, s. 269–278.
- WANG, Z.; YAN, P.; HUI, T.; ZHANG, J., 2014. Epigenetic upregulation of PSD-95 contributes to the rewarding behavior by morphine conditioning. *European Journal of Pharmacology*. Sv. 732, s. 123–129.

- WU, C. T.; R., MORRIS J., 2001. Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. *Science*. Sv. 293, s. 1103–1105.
- WUTZ, A.; SMRZKA, O. W.; SCHWEIFER, N.; SCHELLANDER, K.; WAGNER, E. F.; BARLOW, D. P., 1997. Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature*. Sv. 389, s. 745–749.
- * XU, J.; ANDREASSI, M., 2011. Reversible histone methylation regulates brain gene expression and behavior. *Hormones and Behavior*. Sv. 59, s. 383–392.
- XU, W.; EDMONDSON, D. G.; ROTH, S. Y., 1998. Mammalian GCN5 and P/CAF acetyltransferases have homologous amino-terminal domains important for recognition of nucleosomal substrates. *Molecular and Cellular Biology*. Sv. 18, s. 5659–5669.
- YANG, X. J.; SETO, E., 2008. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Sv. 9, s. 206–218.
- ZACHARIOU, V.; BOLANOS, C. A.; SELLEY, D. E.; THEOBALD, D.; CASSIDY, M. P.; KELZ, M. B.; SHAW-LUTCHMAN, T.; BERTON, O.; SIMSELLEY, L. J.; DILEONE, R. J.; KUMAR, A.; NESTLER, E. J., 2006. An essential role for Δ FosB in the nucleus accumbens in morphine action. *Nature Neuroscience*. Sv. 9, s. 205–211.
- ZHANG, Z.; PAN, Z. Z., 2010. Synaptic mechanism for functional synergism between delta- and mu-opioid receptors. *The Journal of Neuroscience*. Sv. 30, s. 4735–4745.
- ZHANG, Z.; TAO, W.; HOU, Y. Y.; WANG, W.; KENNY, P. J.; PAN, Z. Z., 2014. MeCP2 repression of G9a in regulation of International Association for the Study of Pain and morphine reward. *The Journal of Neuroscience*. Sv. 34, s. 9076–9087.
- ZHENG, H.; LAW, P. Y.; LOH, H. H., 2012. Non-Coding RNAs Regulating Morphine Function: With Emphasis on the In vivo and In vitro Functions of miR-190. *Frontiers in Genetics*. Sv. 3, s. 113.

* označuje sekundární citace

Internetové zdroje

Information sheet on opioid overdose, 2018. World Health Organization. Dostupné také z: https://www.who.int/substance_abuse/information-sheet/en/. [cit. 2020-04-01].